

• 论 著 •

精神分裂症患者免疫球蛋白核心岩藻糖基化组分的富集纯化及免疫学性质分析

郭 静, 邱锦云, 冯方波[△]

(解放军第二六一医院检验科, 北京 10094)

摘要:目的 建立富集纯化精神分裂症患者免疫球蛋白核心岩藻糖基化组分的平台, 分析其免疫学性质。方法 采用蛋白 G 交联琼脂糖凝胶分离纯化血清免疫球蛋白 G(IgG), 小扁豆凝集素(LCA)亲和层析、富集纯化 IgG 中核心岩藻糖基化组分, 免疫印迹分析 LCA-IgG 的 IgG 亚型。结果 血清 IgG 纯化率为 62%, LCA-IgG 层析得率为 4.59%。精神分裂症患者 LCA-IgG 中可标记到 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 亚型, IgG₄ 未检出; 而健康者 LCA-IgG 可标记到 IgG₁~IgG₄ 全部 4 个亚型。结论 成功建立了富集纯化精神分裂症患者 IgG 核心岩藻糖基化组分的平台, 揭示了患者 LCA-IgG 亚型的分布特点及其与健康者的异同, 为进一步研究患者的免疫病理机制提供了新的思路。

关键词:精神分裂症; 免疫球蛋白; 核心岩藻糖基化; 免疫球蛋白 G 亚型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.23.029

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)23-3433-02

A study on enrichment and purification of core fucose glycosylation and its immunity properties in patients with schizophrenia

Guo Jing, Qiu Jinyun, Feng Fangbo[△]

(Department of Clinical Laboratory, Hospital 261 of PLA, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective To establish a platform for enrichment and purification of core fucose glycosylation and analyse its immunity properties. **Methods** Serum immunoglobulin G(IgG) was separated and purified by using protein G cross-linked sepharose, and core fucose glycosylation components of IgG were enriched and purified by using lens culinaris agglutinin(LCA) affinity chromatography, meanwhile, the isoforms of LCA-IgG were determined by using Western blotting. **Results** The purification rate of serum IgG was 62% and yield rate of LCA-IgG was 4.59%. Serum IgG₁, IgG₂ and IgG₃ were identified except IgG₄ in patients with schizophrenia, while serum IgG₁, IgG₂, IgG₃ and IgG₄ were all identified in healthy individuals. **Conclusion** A method for enrichment and purification of core fucose glycosylation in patients with schizophrenia have been successfully established and distribution characteristics of the LCA-IgG isoforms have been determined, which could provide a new insight into immune pathomechanism of schizophrenia.

Key words: schizophrenia; immunoglobulins; core fucosylation; immunoglobulin G subclass

近年来的研究表明,精神分裂症患者血清中免疫球蛋白[主要是免疫球蛋白 G(IgG)]水平明显高于健康人群^[1-2]。患者免疫球蛋白的糖基化程度,特别是血清中核心岩藻糖缺失的免疫球蛋白水平明显升高^[3]。而免疫球蛋白 Fc 段如果缺乏岩藻糖其抗体活性和 Fc 受体的亲和力会改变^[4]。为进一步研究患者糖基化免疫球蛋白的特性和功能变化,笔者根据小扁豆凝集素(LCA)能特异结合核心岩藻糖结构蛋白质分子的特性^[5],利用 LCA-gyrose 亲和层析技术富集纯化精神分裂症患者血清 IgG 中核心岩藻糖基化组分,并应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)结合免疫化学技术研究精神分裂症患者 IgG-LCA 结合组分的免疫学性质,为进一步研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集符合《中国精神障碍分类与诊断标准(第 3 版)》^[6] 诊断标准,并排除中枢神经系统器质性病变与心、肝、肾等脏器疾病及其他自身免疫性疾病的确诊精神分裂症患者 20 例纳入试验组,其中男 12 例,女 8 例,年龄 18~50 岁。另选取基层体检健康官兵 20 例,性别、年龄与试验组相对应,均为心电图检查及心、肝、肾功能正常者,并排除精神与神经系统疾病及其他自身免疫性疾病的。

1.2 主要试剂 蛋白 G 交联琼脂糖凝胶购自美国 Rockland 公司;LCA-agarose 购自 Vector 实验室;生物素标记小鼠抗人 IgG 亚型血清(IgG₁₋₄)、链霉素亲和素-辣根过氧化物酶

(HRP)均购自美国 Alpha diagnostic 公司;α-甲基-葡萄糖苷、α-甲基-甘露糖苷、丙烯酰胺、双丙烯酰胺等电泳试剂均购自美国 Sigma 公司;其他生化试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 晨间抽取患者空腹血清,每份血清取 1 mL 混合,3 000 r/min 离心 10 min 后收集上清,测总蛋白和 IgG 水平;每管 2 mL 分装,于-30℃冻存备用。同样条件处理的 20 份对照组血清标本。

1.3.2 蛋白 G 交联琼脂糖凝胶分离纯化精神分裂症患者血清 IgG 参照有关文献及蛋白 G 交联琼脂糖凝胶使用说明书进行,纯化后的 IgG 应用 10% SDS-PAGE 电泳及 HRP 标记的羊抗人 IgG 作分子探针鉴定其特异性与电泳特性。测 IgG 水平,分装冻存。

1.3.3 精神分裂症患者血清 IgG 中核心岩藻糖基化组分的富集纯化 (1)取 5 mL LCA-agarose 装柱,用 20 倍柱床体积、pH 7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗去储存液。(2)取经蛋白 G 纯化的患者 IgG 4 mL(含 IgG 13.5 mg)加至 LCA 凝胶表面,收集穿流液反复上样 3~5 次,使目标蛋白充分与凝胶结合。(3)用 10 个柱床体积平衡缓冲液洗柱子,流速控制在 0.5 mL/min,收集穿流液,每管 1.0 mL,洗至 280 nm 处吸光度(A₂₈₀)值降至基线,此为柱不结合部分。(4)用洗脱液(200 mmol/L α-甲基-甘露糖苷与 200 mmol/L α-甲基-葡萄糖苷混合液)洗柱子,流速控制在 0.5 mL/min,收集洗脱液每管 1.0 mL,至 A₂₈₀

值降至近基线,终止洗脱,此为柱结合部分,收集合并 A₂₈₀ 值较高的管内样品,测蛋白质浓度,分装,冷冻干燥, -30 °C 冻存。

1.3.4 精神分裂症患者 IgG 中核心岩藻糖组分的 IgG 亚型分析 将纯化的精神分裂症患者 LCA-IgG 常规进行 SDS-PAGE 电泳,并转移到硝酸纤维素膜上,将此硝酸纤维素膜纵向切成适当宽度的条带,将膜浸入封闭液处理 30 min 后,分别浸入封闭液稀释的一抗:生物素标记的小鼠抗人 IgG₁ (稀释度 1:400)、IgG₂ (稀释度 1:300)、IgG₃ (稀释度 1:1 000)、IgG₄ (稀释度 1:300) 中,37 °C 保温 2 h,洗膜液洗 3 次,每次 5~10 min,将膜浸入二抗(链霉素亲和素-HRP)中,37 °C 保温 1 h,洗膜液洗 3 次,每次 5~10 min 后在底物联苯茴香胺中显色,照相保存。

2 结 果

2.1 精神分裂症患者血清 IgG 患者血清 IgG 的纯化率为 62%,用 10% SDS-PAGE 电泳鉴定,在还原型凝胶上重链的相对分子质量为 54×10³,轻链为 24×10³,染色比例约 2:1,纯能满足实验要求。

2.2 精神分裂症患者血清 IgG 核心岩藻糖基化组分的富集纯化 实验结果显示,精神分裂症患者血清 IgG 经 LCA 亲和层析分离为两个组分,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。其中 peak-1 所示为 IgG 经层析柱后平衡液洗脱得到的柱不结合组分,由非核心岩藻糖基化蛋白质构成;peak-2 所示为 α-甲基-甘露糖苷及 α-甲基葡萄糖苷混合液洗脱得到的柱结合组分,由核心岩藻糖基化蛋白质构成。柱结合组分得到的蛋白量与上柱蛋白量相比层析得率为 4.59%。将 LCA 层析得到的两组分蛋白与血清 IgG 进行 SDS-PAGE 电泳,显示与 LCA 结合的低丰度 IgG 得到富集。柱结合组分在 54×10³ 处有一条浓集的条带,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

2.3 精神分裂症患者 IgG 中核心岩藻糖基化组分的亚型分析 应用生物素标记的小鼠抗人 IgG 亚型(IgG₁₋₄)单克隆抗体及 HRP-链霉素亲和素系统作为分子探针,标记精神分裂症患者 IgG 中用 LCA 富集纯化的核心岩藻糖基化组分经 SDS-PAGE 电泳并转移到硝酸纤维素膜上的电泳条带,实验结果显示,精神分裂症患者 LCA-IgG 可标记到 IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄ 未显示。以条带的深浅粗略判断其水平的多寡,依次为 IgG₁、IgG₂、IgG₃。而在相同实验条件下,对照组则可标记到 IgG₁~IgG₄ 全部 4 种亚型。

3 讨 论

IgG 是机体体液免疫的主要承担者,占免疫球蛋白总量的 75%~80%,IgG 的分离纯化是研究 IgG 的基础。蛋白 G 交联琼脂糖凝胶具有与 IgG 的 Fc 段特异结合的特性,且与人 IgG 的 4 个亚型均有很强的结合力^[7],较适用于从人血清中提取 IgG 用于后续研究。此方法简便易行,无需特殊设备,适宜一般实验室采用。

蛋白质的核心岩藻糖基化修饰普遍存在于糖蛋白中,机体处于病理状态时,蛋白质核心岩藻糖基化通常会发生改变^[8]。精神分裂症患者免疫球蛋白核心岩藻糖基化水平明显高于对照组,且与血清总 IgG 水平无明显相关性,提示患者体液免疫功能异常与免疫球蛋白过度糖基化有关^[3]。由于 LCA 对具有核心岩藻糖结构的蛋白质分子有很强的亲和力,可应用 LCA 凝集素亲和层析分离和富集血清 IgG 中核心岩藻糖基化的蛋白质。为了进一步研究精神分裂症患者核心岩藻糖基化免疫球蛋白的免疫学性质,笔者建立了 LCA 凝集素亲和层析富集纯化血清 IgG 核心岩藻糖基化组分的平台,筛选并富集到精神分裂症患者血清 IgG 中核心岩藻糖基化组分,并得到电泳

纯的样品。血清 IgG 的纯化率为 62%,用 10% SDS-PAGE 电泳鉴定,在还原型凝胶上重链的相对分子质量为 54×10³,轻链为 24×10³,染色比例约 2:1,与文献^[7]报道相近。由于血清 IgG 中核心岩藻糖基化组分浓度很低,在实际操作中可采取反复上样并严格控制流速的方式以增加目标 IgG 与 LCA 的结合率,实验结果显示,提取率可达 4.59%,与文献报道的提取率相近。

IgG 作为重要的免疫效应分子,基于抗原性及结构上的特点,人类 IgG 可分为 4 个亚型,其中 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 及 IgG₄ 分别占 60.9%、29.6%、5.3%、4.2%,各亚型间亦存在生理功能上的差异^[9]。在机体免疫应答过程中,IgG₁、IgG₃ 发挥有效的调理作用和抗体依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)效应,并有很强的补体结合作用。而 IgG₂、IgG₄ 作用较弱或无^[10]。本研究结果显示,精神分裂症患者核心岩藻糖基化 IgG 中,可检测出 IgG₁、IgG₂、IgG₃,而未检出 IgG₄ 亚型;而在相同实验条件下,健康者 LCA-IgG 可检测出 IgG₁~IgG₄ 全部 4 种亚型,粗略判断其浓度也与文献^[8]报道相近。研究结果揭示了精神分裂症患者核心岩藻糖基化 IgG 的亚型分布特点及其与健康者的异同。其 IgG 亚型条带检出与否及浓度水平也与各亚型 IgG 发挥的生理效应相关。

综上所述,本研究从免疫球蛋白糖基化层面为研究精神分裂症免疫病理机制提供了新的思路。在正常生理状态下 IgG 核心岩藻糖基化水平很低,但精神分裂症患者 LCA-IgG 水平增高的机制尚未完全明了。在此基础上对 LCA-IgG 各亚型的定量研究及对 IgG 过度岩藻糖基化引发的 IgG 构象与功能变化的深入研究,将对揭示精神分裂症患者免疫病理机制有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 陈金弟,李华良,赖淑珍.精神分裂症患者脑组织免疫组化染色[J].临床检验杂志,2002,20(5):298.
- [2] 闫先侠,牛爱军.精神分裂症患者血清免疫球蛋白及补体含量分析[J].精神医学杂志,2006,19(1):21-22.
- [3] 郭静,邱锦云,冯方波.精神分裂症患者血清免疫球蛋白核心岩藻糖基化水平与体液免疫指标的相关性研究[J].国际检验医学杂志,2014,35(19):2626-2627.
- [4] 陈玉强,王元.丙种免疫球蛋白 Fc 段糖基化及其生物活性和功能[J].现代生物医学进展,2008,18(7):1368-1370.
- [5] 王亚东,陈亚宝,朱家沂,等.核心岩藻糖基化 r-GT 测定对原发性肝癌的诊断价值[J].中华消化杂志,2000,20(4):278-279.
- [6] 中华医学会精神科分会.中国精神障碍分类与诊断标准[M].3 版.济南:山东科学技术出版社,2001:83-85.
- [7] 曹雪涛.免疫学技术及其应用[M].北京:科学出版社,2010:213-214.
- [8] 代智,樊嘉,周俭,等.人健康肝组织核心岩藻糖基化蛋白质的鉴定及生物信息学分析[J].生物化学与生物物理进展,2008,35(5):555-562.
- [9] 王重庆.分子免疫学基础[M].北京:北京大学出版社,1999:59-65.
- [10] 塔克·马可,玛丽·桑德斯.吴玉章译.免疫应答导论[M].北京:科学出版社,2012:102.

(收稿日期:2015-06-18)

